

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



NICOLETTE HATASOVÁ

**Fytoextrakce vybraných farmak**

**Phytoextraction of Selected Pharmaceuticals**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Ing. Stanislav Smrček, CSc.

Praha 2016

### *Prohlášení*

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně, pod odborným vedením Doc. Ing. Stanislava Smrčka, CSc. a konzultantky Ing. Šárky Pšondrovej. V práci jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu, v souladu s právními předpisy a vnitřními předpisy Univerzity Karlovy. Tato práce nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 3.5.2016

---

Nicolette Hatasová

## *Podakovanie*

Rada by som sa poďakovala svojmu vedúcemu bakalárskej práce Doc. Ing. Stanislavovi Smrčkovi, CSc., za jeho odborné vedenie, ochotu, čas a trpezlivosť pri riešení tejto práce. Ďalej by som sa rada poďakovala Ing. Šárke Pšondrovej za jej pomoc pri experimentálnej časti práce. Veľká vďaka patrí aj mojej rodine, ktorá ma po celý čas morálne aj finančne podporovala, aby som štúdium úspešne ukončila.

## Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je studium fytoextrakce trazodonu, který tvoří aktivní složku antidepresiva prodáváného v ČR pod názvem Trittico. Trazodon nepodléhá úplné metabolizaci, část je z těla exkretována v původní formě do komunálních odpadních vod. Fytoextrakce představuje novou a zcela šetrnou metodu, která je využívána k odstranění zbytkových koncentrací polutantů z vodního ekosystému. Tyto látky se dostávají do životního prostředí i po přечиštění v čistírnách odpadních vod. Úprava vody tímto způsobem není dostačující, což souvisí s hledáním nových a účinnějších metod.

V práci byly testovány rostliny kukuřice seté (*Zea mays*), u kterých fytoextrakční účinnost byla sledována po dobu osmi dnů. Úbytky trazodonu v jednotlivých kultivačních mediích byly stanoveny pomocí HPLC. Výsledky prokázaly, že vybrané antidepresivum bylo během experimentu částečně extrahováno z vodných roztoků a možnost zachytu kořenovým systémem je tak reálná.

Klíčová slova: fytoextrakce, čistírna odpadních vod, odpadní voda, znečištění, antidepresiva, trazodon

## Abstract

The aim of this bachelor thesis is a study of phytoextraction of trazodone which represents the active component of an antidepressant sold under the name Trittico. Trazodone is not completely metabolized in organisms and part of drug is excreted unchanged by urinary system to wastewater. Phytoextraction represents new and economical method used to remove residual concentrations of pollutants in aquatic ecosystems. These substances enter the environment even after previous cleaning in wastewater treatment plants. The removal of pharmaceutical residues is generally not sufficient which is related to development of more effective methods.

Plant maize (*Zea mays*) was used for this experiment in which degradation effectivity was monitored for eight days. Concentrations of trazodone in various cultivations were determined by HPLC. Results showed that selected antidepressant was extracted during the experiment and phytoextraction took place.

Key words: phytoextraction, wastewater treatment plants, wastewater, pollution, antidepressants, trazodone

## Abstrakt

Cieľom tejto bakalárskej práce je štúdium fytoextrakcie trazodónu, ktorý tvorí aktívnu zložku antidepresívneho prípravku predávaného pod názvom Trittico. Trazodón nepodlieha úplnej metabolizácii, ale časť je z tela vylúčená v pôvodnej forme do odpadných vôd. Fytoextrakcia predstavuje novú a šetrnú metódu, ktorá je využívaná na odstránenie zostatkových koncentrácií polutantov z vodného ekosystému. Tieto látky sa dostávajú do životného prostredia po predošlom prečistení v čistiarnach odpadových vôd. Úprava vody týmto spôsobom nie je dostačujúca, čo súvisí s hľadaním nových a účinnejších metód.

Na tento experiment boli použité rastliny kukurice siatej (*Zea mays*), ktorých degradačná účinnosť bola sledovaná po dobu ôsmich dní. Koncentrácie trazodónu v jednotlivých kultiváciách boli stanovené pomocou HPLC. Výsledky preukázali, že vybrané antidepresívum bolo počas experimentu z vodných roztokov čiastočne extrahované a možnosť záchytu koreňovým systémom je reálna.

Kľúčové slová: fytoextrakcia, čistiareň odpadových vôd, odpadová voda, znečistenie, antidepresíva, trazodón

<b>1.ÚVOD .....</b>	<b>- 9 -</b>
<b>2. TEORETICKÁ ČASŤ.....</b>	<b>- 11 -</b>
2.1 FARMAKÁ V EKOSYSTÉME.....	- 11 -
2.1.1 <i>Prítomnosť farmák vo vode .....</i>	<i>- 11 -</i>
2.1.2 <i>Endokrinné disruptory vo vodnom ekosystéme .....</i>	<i>- 12 -</i>
2.2. DEKONTAMINÁCIA PODZEMNÝCH VÔD, BIOREMEDIÁCIA .....	- 13 -
2.2.1 <i>Fytoremediačné techniky .....</i>	<i>- 14 -</i>
2.2.2 <i>Výhody a nevýhody fytoremediácií.....</i>	<i>- 16 -</i>
2.3 ANTIDEPRESÍVA .....	- 17 -
2.3.1 <i>Využitie trazodónu pri liečbe depresie .....</i>	<i>- 18 -</i>
2.3.2 <i>Metabolizmus xenobiotík v živočíšnej a rastlinnej ríši.....</i>	<i>- 19 -</i>
2.3.3 <i>Metabolizmus trazodónu .....</i>	<i>- 21 -</i>
<b>3. CIEĽ BAKALÁRSKEJ PRÁCE .....</b>	<b>- 23 -</b>
<b>4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ .....</b>	<b>- 24 -</b>
4.1 POUŽITÝ MATERIÁL .....	- 24 -
4.1.1 <i>Použité chemikálie .....</i>	<i>- 24 -</i>
4.1.2 <i>Rastliny použité na experiment .....</i>	<i>- 25 -</i>
4.1.3 <i>Prístrojové vybavenie.....</i>	<i>- 25 -</i>
4.2 POSTUP PRÁCE.....	- 26 -
4.2.1 <i>Kultivácia rastlinného materiálu in vitro metódou .....</i>	<i>- 26 -</i>
4.2.2 <i>Fytoextrakcia trazodónu .....</i>	<i>- 27 -</i>
4.2.3 <i>HPLC analýza roztokov trazodónu .....</i>	<i>- 27 -</i>
<b>5.VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>- 28 -</b>
5.1 KALIBRÁCIA .....	- 29 -
5.2 ÚČINNOSŤ FYTOEXTRAKCIE TRAZODÓNU .....	- 29 -
5.3 ANALÝZA ROZTOKOV .....	- 32 -
<b>6. ZÁVER .....</b>	<b>- 35 -</b>
<b>7. LITERATÚRA.....</b>	<b>- 36 -</b>

## Zoznam skratiek

ČOV	Čistiareň odpadových vôd (Wastewater Treatments Plants)
DDD	Definovaná denná dávka
DDT	Dichlórdifenyltrichlóretán [1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorofenyl)etán]
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EDCs	Endokrinné disruptory (Endocrine Disrupting Chemicals)
HPLC	Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (High-Performance Liquid Chromatography)
LOQ	Limit kvantifikácie (Limit of Quantification)
<i>m</i> CPP	<i>Meta</i> -chlórphenylpiperazín
MS médium	Murashige a Skoog kultivačné médium
PPCPs	Liečivá a produkty osobnej starostlivosti (Pharmaceuticals and Personal Care Products)
SSRI	Selektívne inhibitory spätného vychytávania sérotonínu (Selective Serotonin Reuptake Inhibitor)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
UV	Ultrafialové žiarenie

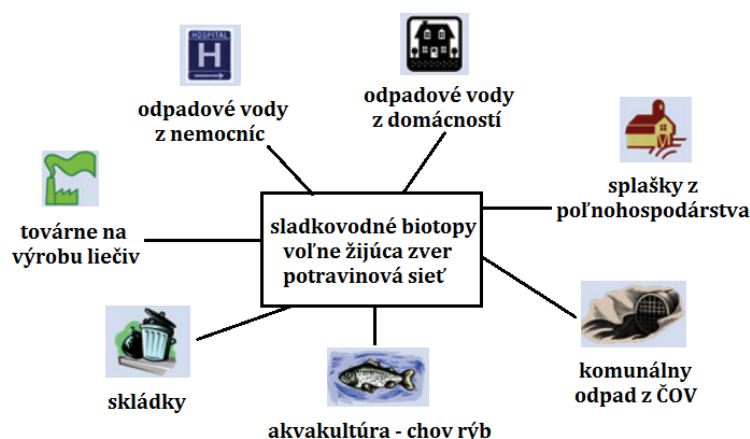


# 1. ÚVOD

Environmentálne znečistenie v dnešnej dobe priťahuje stále väčšiu pozornosť. Látky produkované ľudskou činnosťou, dostávajúce sa do životného prostredia sú inak označované ako antropogénne polutanty. Ide o skupinu perzistentných organických polutantov (POP), polychlórovaných bifenylov (PCB), polycyklických aromatických uhlíkov (PAH) a v neposlednom rade liečiv<sup>1</sup>. Rozvoj chemického priemyslu a farmácie prispel k zvýšeniu produkcie liečivých prípravkov. Prvé detekované farmaká odtekajúce z ČOV boli hormóny, v 80-tych rokoch minulého storočia<sup>2</sup>. Z dôvodu malej spotreby liečivých prípravkov boli v tom čase výskyt a samotná koncentrácia pomerne nízke.

V súčasnej dobe globálna spotreba liečiv neustále rastie. Predávané liečivá obsahujú stovky rôznych účinných látok, ktorými sú napríklad antidepresíva, antibiotiká, lieky na tlmenie bolesti, hormonálna antikoncepcia a iné. Bolo zistené, že vody ošetrované čistiarnou odpadových vôd napriek tomu obsahujú stopy organických nečistôt. Tieto zlúčeniny sú pozostatkami kozmetických výrobkov a PPCPs (farmaká a produkty osobnej starostlivosti). V dôsledku neustáleho pôsobenia reziduí farmák a ich metabolitov, existuje riziko ekologických problémov a zvýšenej kontaminácie podzemných vôd<sup>3</sup>. Liečivá sa do odpadových vôd dostávajú dvoma cestami. Prechádzajú ľudským metabolizmom, kedy sa do vody dostávajú prostredníctvom moču alebo v dôsledku likvidácie nadbytku farmák z domácností<sup>4</sup>. Tok liečiv prúdiacich do životného prostredia je znázornený na obrázku č. 1.1.

Obr. 1.1: Tok liečiv v životnom prostredí<sup>5</sup>.



Farmaceutické produkty predstavujú liečivá s vysokou biologickou aktivitou, ktoré sú organizmami transformované a sčasti vylučované. Tieto látky sú metabolizované a prostredníctvom moču vylúčené do odpadných vôd. Systémy v čistiarniach odpadových vôd nie sú schopné úplne odstrániť niektoré zlúčeniny, a tak sú vypúšťané do vodných ekosystémov. S tým súvisí aj problém výskytu reziduí farmák v pitnej vode. Technológie na úpravu povrchových vôd sú síce účinné, ale vo veľmi malých koncentráciách sa zvyšky farmák spätne vracajú vodou do ľudského organizmu<sup>6</sup>. Využívanie liečivých prípravkov predstavuje nekončiaci kolobeh antropogénnych polutantov v životnom prostredí, ktorých producentom a distribútorom je sám človek. Liečivá sú biologicky aktívne a v dôsledku dlhodobého pôsobenia nízkych koncentrácií predstavujú nebezpečenstvo pre živé organizmy. Môžu škodiť vodným organizmom, spôsobovať abnormálne zmeny v DNA a iné endokrinné poruchy, ktorými je poškodená hormonálna činnosť organizmu<sup>7</sup>.

V dnešnej dobe sú techniky na čistenie odpadových vôd finančne náročné a jednu z metód, ktoré by bolo možné použiť predstavuje fytoremediácia. Ide o metódu využitia zelených rastlín na dočistenie vôd od polutantov. Táto metóda predstavuje mnoho výhod, či už po ekonomickej stránke alebo šetrným zaobchádzaním so životným prostredím.

## 2. TEORETICKÁ ČASŤ

### 2.1 Farmaká v ekosystéme

Veda a technológie umožnili v posledných desaťročiach nadmernú produkciu látok, ktoré nazývame xenobiotiká, umelo syntetizované látky. Medzi ne patria liečivá, jedy, či priemyselné chemikálie<sup>8</sup>. Liečivá obecné predstavujú biologicky aktívne látky, ktoré by v ideálnom prípade mali byť ľahko degradovateľné. V dnešnej dobe ale zastávajú dôležitú úlohu pri prevencii a liečbe rôznych ochorení, či už u človeka alebo zvierat<sup>9</sup>. V dôsledku vysokej spotreby liečivých prípravkov ich nájdeme v odpadových vodách, odkiaľ ľahko doputujú aj do prírodných vôd, čím sa stávajú nebezpečnými pre živočíchy aj ľudský organizmus<sup>10</sup>.

#### 2.1.1 Prítomnosť farmák vo vode

V globálnej mierke, kontaminácie pitnej vody predstavujú najvýznamnejšie riziko pre človeka. Príčinou sú nepatogénne, toxické znečisťujúce látky, ktoré sú globálne všadeprítomné vo vodách<sup>11</sup>. Farmaká sa dostávajú do životného prostredia z najväčšej časti z domácností. Väčšina z nich je perzistentná a navrhnutá tak, aby sa zamerala na konkrétnu metabolickú dráhu<sup>10</sup>. Polovica pitnej vody v ČR je vyrábaná z podzemných vôd a druhá z povrchovej vody, ktorá pochádza z horných tokov riek a vodných nádrží, kde sú koncentrácie kontaminantov relatívne nízke. Štátny zdravotný ústav v ČR v rokoch 2009-2011 uskutočnil screening liečiv v pitných vodách v ČR. Hlavným cieľom bolo monitorovanie výskytu liečiv a z toho vyplývajúce zdravotné riziko. Výskum prebiehal v troch etapách, počas ktorých sa sledovala koncentrácia piatich vybraných látok: naproxén, ibuprofén, diklofenak, karbamazepín a 17 $\alpha$ -etinylestradiol. Tretia etapa bola zameraná na oblasti s najvyššími zistenými koncentraciami týchto látok. Z celkového počtu 100 vzoriek vody z vodovodov bol len v troch prípadoch zistený kladný nález. Jednalo sa hlavne o látku ibuprofén (0,5 – 1,2 ng.L<sup>-1</sup>). Zistená koncentrácia 17 $\alpha$ -etinylestradiolu, nachádzajúceho sa v hormonálnej antikoncepcii bola v posledných dvoch etapách menšia než je LOQ - 2ng.L<sup>-1</sup>. Čo sa týka pitnej vody, koncentrácie vyššie spomínaných liečiv poukazujú na fakt, že kontaminácia pitnej

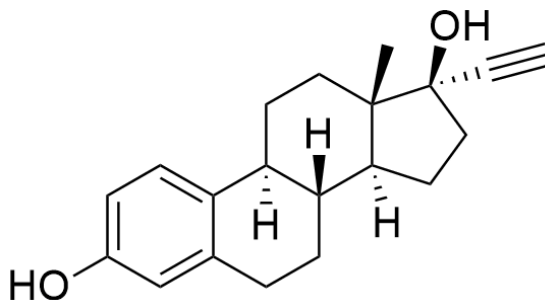
vody je veľmi malá. To sa však netýka vody, ktorá je používaná napríklad na poľnohospodárske účely.<sup>4</sup>

### 2.1.2 Endokrinné disruptory vo vodnom ekosystéme

Medzi endokrinné disruptory patria napríklad polychlórované bifenyly, ftaláty, DDT, bisfenol A, dioxíny. Jedným z najväčších rizík v akvatickom ekosystéme je prítomnosť hormonálne aktívnych látok. Endokrinné disruptory (EDCs) sú látky exogénneho pôvodu, ktoré menia funkciu endokrinného systému, čo vplýva na zdravie a potomstvo organizmov. Viaceré štúdie preukázali, že v dôsledku prítomnosti estrogénnych chemikálií dochádza k feminizácii samcov vodných živočíchov, najmä u rýb<sup>12</sup>.

Látky ako 17 $\alpha$ -dihydroxyprogesterón, estriol, estrón alebo 17 $\beta$ -estradiol patria k feromónom, hormonálnym odorantom u rýb. Do vody sú vypúšťané len jedným pohlavím, aby vyvolali fyziologickú a behaviorálnu odozvu opačného pohlavia. V súčasnosti sa vyrábajú farmaceutické preparáty obsahujúce estrogény. Najväčšie zastúpenie 17 $\alpha$ -etinyloestradiol na obrázku č. 2.1, ktorý je účinnou látkou v kombinovanej hormonálnej antikoncepcii. Tieto látky sú schopné napodobniť štruktúru prírodných estrogénov a ich metabolitov, a tým ovplyvniť hormonálny vývoj jedinca<sup>12</sup>. Tieto látky sú v tele metabolizované a spolu s kyselinou glukorónovou vylúčené ako súčasť moču. Existuje čoraz viac evidencií o náleze týchto polutantov v mestských odpadových vodách. Z prečistenej splaškovej vody sa dostávajú späť do životného prostredia ako syntetický estrogén a kyselina glukorónová.

Obr 2.1: 17 $\alpha$ -etinyloestradiol-[19-nor-17 $\alpha$ -pregna-1,3,5(10)-trién-20-yn-3,17-diol].



Za posledné roky výrazne stúpol záujem o štúdium endokrinných disruptorov. Napriek tomu, že je možná ich detekcia vo vodnom ekosystéme, je ťažké určiť ich účinkov na voľne žijúce živočíchy. V posledných rokoch sa pri tomto type kontaminácie začalo uvažovať o využití fyto-remediácie ako modernej ekologickej techniky, ktorá za pomoci rastlín dokáže znížiť, či dokonca úplne eliminovať polutanty z vodných biotopov. Naďalej však nie je jasné, ako táto metóda ovplyvňuje rastlinu ani priebeh akumulácie a biotransformácie<sup>13</sup>.

## 2.2 Dekontaminácia podzemných vôd, bioremediácia

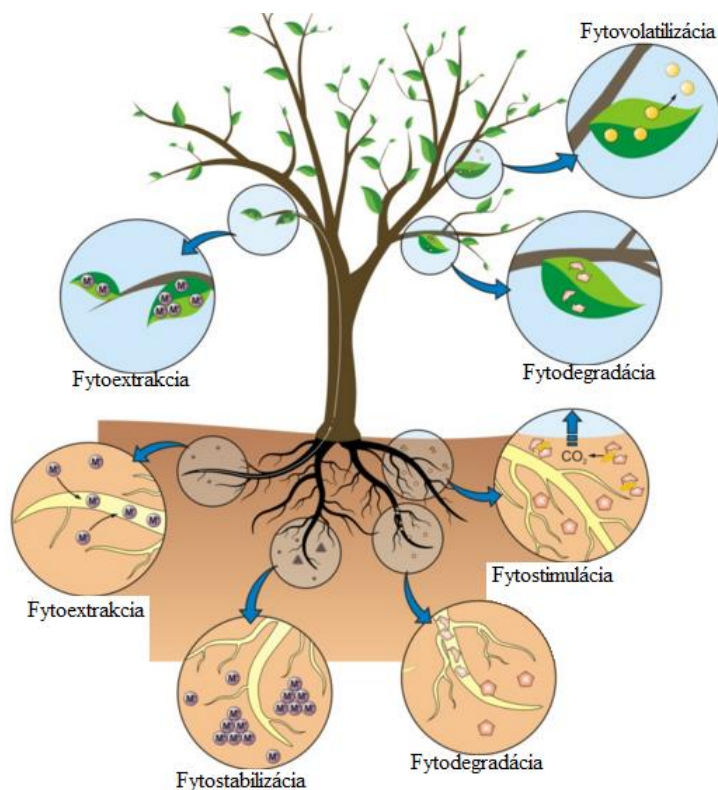
Úlohou bioremediačných techník je premena environmentálnych kontaminantov na menej toxické alebo imobilizované formy za použitia živých organizmov. Na vyčistenie kontaminovanej pôdy a vody sa využívajú najmä baktérie, huby a rastliny schopné detoxikovať zdraviu škodlivé látky a látky nebezpečné pre životné prostredie. K vyčisteniu kontaminácie za pomoci mikroorganizmov musia byť použité tie, ktoré dokážu enzymaticky atakovať polutant a premeniť ho na menej toxický produkt. Bioremediácia môže byť uskutočnená v oblasti, kde sú dobré podmienky pre mikrobiologické bujnenie a aktivitu. Biodegradačný proces ovplyvňuje veľké množstvo faktorov, ktoré musia byť splnené na to, aby mikrobiologická populácia bola schopná polutanty degradovať. Medzi environmentálne faktory patrí teplota, pH, prítomnosť kyslíku, živiny. V prípade *in situ* ide o techniku aplikovanú priamo v mieste kontaminácie podzemných vôd a pôd s menším znečistením. *Ex situ* metóda je aplikovaná na pôdu a podzemné vody mimo jej prirodzeného prostredia. Princípom je odobranie znečistenej vody alebo pôdy a jej presun do inej oblasti, kde je následne spracovaná a dekontaminovaná<sup>14</sup>.

### 2.2.1 Fytoremediačné techniky

Fytoremediáciu charakterizuje použitie zelených rastlín k akumulácii alebo odstráneniu kontaminantov zo životného prostredia. Niektoré druhy rastlín sú schopné efektívne akumulovať, imobilizovať alebo premieňať kontaminanty na menej toxické formy. Fytoremediácia je najúčinnnejšia na odstránenie povrchového znečistenia do hĺbky 5 m<sup>8, 14</sup>. Fytoremediačné techniky sa využívajú na sanáciu iónov ťažkých kovov, rádionuklidov, výbušnín, pesticídov a zvyškov liečiv. Čím je látka rozpustnejšia, tým je viac dostupná pre mikroorganizmy a tie ju následne lepšie rozkladajú<sup>14</sup>.

Fytoremediáciu delíme podľa mieri znečistenia na fytostabilizáciu a fytodekontamináciu. Pri fytostabilizácii niektoré druhy rastlín dokážu znížiť rozpustnosť látky, a tým zabrániť jej šíreniu sa do životného prostredia. Pri fytodekontaminácii dokážu rastliny pomocou prirodzenej mikroflóry na koreňoch rastlín priamo čistiť kontaminovanú pôdu<sup>8</sup>. Na obrázku č. 2.2 sú zobrazené jednotlivé druhy fytoremediačných stratégií.

Obr. 2.2: Druhy fytoremediačných stratégií<sup>15</sup>.



*Fytoextrakcia (fytoakumulácia)* je proces, pri ktorom sú rastliny používané k absorpcii a nasledovnej akumulácii kontaminantov v koreňovej časti rastliny alebo v listoch. Táto metóda je výhodná najmä pre sanáciu ťažkých kovov, polokovov, či rádionuklidov. Z koreňovej časti môže byť xenobiotikum tiež prenesené do ostatných častí rastliny, napríklad listov, kde môže byť čiastočne uložené alebo transformované. Rastliny akumulujúce toxické látky vo vysokých koncentráciách sú nazývané aj hyperakumulátory. Nahromadené polutanty sú po určitej dobe zozbierané a tepelne, chemicky alebo mikrobiálne spracované<sup>14, 15, 16</sup>.

*Fytostabilizácia* sa využíva pri veľkej kontaminácii ťažkými kovmi, napríklad na odkaliskách. Rastliny sú schopné stabilizovať mobilitu a migráciu kontaminantov, buď pomocou redoxných premien, teda prevedenia kontaminantu na nerozpustnú formu alebo zabudovaním do rastlinného pletiva. Nahromadený kontaminant v koreňovom systéme zostáva stabilizovaný a nevracia sa do okolitého prostredia<sup>15, 16</sup>.

Pri *fytovolatilizácii* dochádza k premene polutantu na prchavú formu pomocou enzýmov a k jej transpirácii do ovzdušia. Táto metóda sa využíva najmä na odstránenie organických polutantov, ale jej nevýhodou je neúplná degradácia. Nedochádza tu k degradácii, ale len k presunu kontaminantu z pôdneho ekosystému do ovzdušia<sup>14, 16</sup>.

V oblastiach, kde je kontaminácia polutantov nízka, sa využíva *rhizofiltrácia*, pri ktorej sú kontaminanty zachytené koreňovým systémom. Je dobrou metódou na zachytenie rádionuklidov z povrchových, splaškových, ale aj podzemných vôd. Pri niektorých experimentoch bolo preukázané výrazné zníženie koncentrácie chrómu, či kobaltu z vodného ekosystému v priebehu 24 hodín<sup>14, 16</sup>.

*Fytodegradácia (rhizodegradácia)* je jednou z metód na odstránenie organických molekúl v tkanive rastlín alebo ich premenu na netoxickú formu. Pri tomto procese je dôležitá rastlina, tak ako jej korene, ktoré vylučujú látky ako aminokyseliny, organické kyseliny, jednoduché cukry, ktoré sú potrebným zdrojom energie pre mikroorganizmy pôsobiace v okolí koreňového systému. V jeho okolí žije veľké množstvo mikroorganizmov a mykorhíznych húb. Táto rhizosféra mikrofóra dokáže pomocou rôznych metabolických dráh transformovať polutanty. Nutné je oblasť neustále monitorovať, aby nedošlo k vzniku toxických metabolitov. Táto metóda je vhodná na odstránenie PAH, chlórovaných pesticídov či detergentov<sup>14</sup>. Stručný prehľad využitia fytoimediačných techník je zhrnutý v tabuľke č. 2.1.

Tab. 2.1: *Prehľad využitia fytoremediácií*<sup>14</sup>.

<i>Technika</i>	<i>Rastlinný mechanizmus</i>	<i>Použitelnosť</i>
Fytoextrakcia	Príjem a koncentrácia kovu priamo do rastlinného tkaniva, následné odstránenie rastlín	Pôda
Fytotransformácia	Príjem rastlinou a odbúranie organických zlúčenín	Povrchová voda, podzemná voda
Fytostabilizácia	Koreňové exsudáty spôsobia vyzrážanie kovu, stávajú sa menej dostupnejšími	Pôdy, podzemná voda, hlušiny, odkaliská
Fytodegradácia	Zlepšenie mikrobiálnej degradácie v oblasti rhizosféry	Pôda, podzemná voda v rámci rhizosféry
Rhizofiltrácia	Príjem kovov do rastlinných koreňov	Povrchová voda a čerpaná voda
Fytovolatilizácia	Evapotranspirácia selénu, ortuti a prchavých uhlíkovodíkov	Pôda a podzemná voda
Vegetačná pokrývka	Dažďová voda je evapotranspirovaná rastlinami, aby sa zabránilo lúhovaniu kontaminantov v čistených lokalitách	Pôda

### 2.2.2 Výhody a nevýhody fytoremediácií

Najväčšou *výhodou* je skutočnosť, že rastliny používajú pri remediačnej činnosti slnečnú energiu. Je možné sledovať degradáciu kontaminantu v čase, čo umožňuje vidieť, či je daná rastlina vhodná na sanáciu. Priaznivé je vyčistenie *in situ* do biologicky bezpečného stavu. Nie je teda potrebné využívanie ťažkej techniky ani prevoz kontaminovaného materiálu. Dôležitá je ekonomická výhoda tejto metódy, ktorá samozrejme závisí na druhu kontaminácie, miestnych podmienok.

*Nevýhodou* fytoextrakcie je aplikácia určitých rastlinných druhov. Niektoré sú schopné prežívať v kontaminovaných vodách a pôdach s nedostatkom živín, ale ich využitie je limitované. Rast je pomalý a množstvo biomasy je často nedostačujúce pre celkovú sanáciu danej oblasti. Ozdravovanie prostredia je taktiež limitované hĺbkou koreňov a veľkosťou plochy znečisteného prostredia. Toxicita v oblasti znečistenia



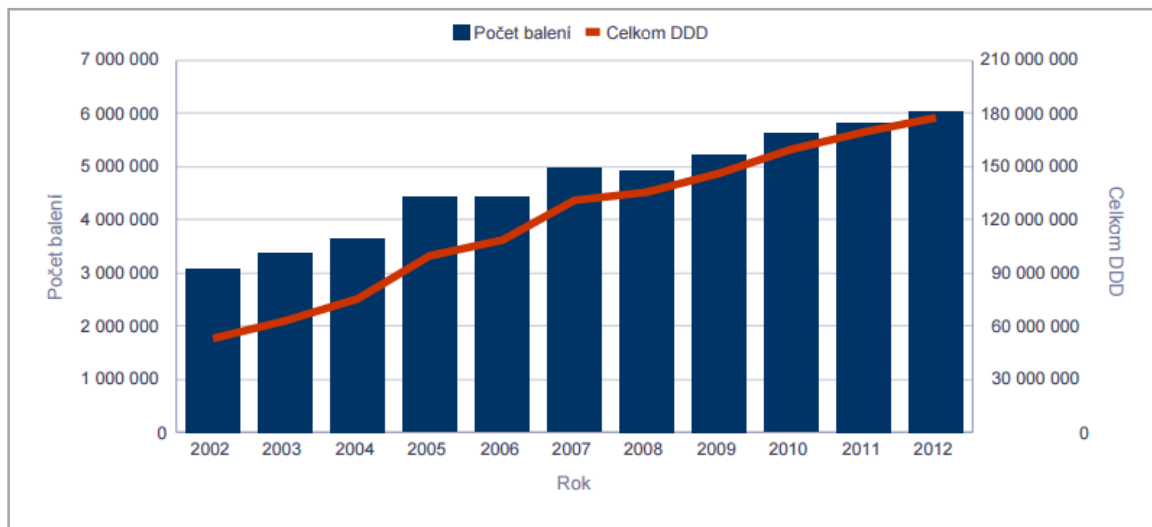
limituje prežitie rastlín. Jednu z nevýhod predstavuje samotná aplikácia, pretože fytoextrakciu nie je možné použiť na všetky druhy znečistenia<sup>8</sup>.

Bioremediácie majú napriek tomu svoje limity. Kontaminanty ako napríklad chlórované organické látky, či aromatické uhľovodíky sú odolné voči mikrobiálnemu napadnutiu a ich odstránenie je náročné<sup>14</sup>. Fytoremediácia predstavuje efektívnu metódu na kontrolu a odbúravanie xenobiotík, ktorá sa neustále sleduje a vyvíja. Baktérie sú najviac využívanými na sanáciu vôd, pretože rastliny potrebujú dlhší čas na samotný rast a nasledovnú degradáciu kontaminantu<sup>8</sup>.

## 2.3 Antidepressíva

Depresie predstavujú jednu z najčastejších psychických porúch. Prejavujú sa spomalením psychických funkcií, smútkom, strachom, pesimizmom, môžu skončiť aj samovraždou. Depresie môžu byť reaktívne, ktoré vznikajú ako reakcie na reálny podnet alebo endogénne depresie, ktorých príčinou je biochemická porucha a neschopnosť zvládnuť bežnú psychickú záťaž. Periodické depresie sú tiež spojené s maniodepresívnymi psychózami, ktoré sprevádza cyklické striedanie manických a depresívnych stavov. Príčinou endogénnych depresíí je znížený obsah noradrenalínu, sérotonínu (5-hydroxytryptamín) a dopamínu v oblasti nervových synapsíí. Antidepressíva sú látky, ktoré upravujú afektivitu (citový život) jedinca. Patria medzi liečivá schopné potlačiť depresiú a stavy sklúčenosti. Koncentráciu neurotransmitorov je možné zvýšiť pomocou thymoleptík alebo thymoeritík. Práve thymoleptiká inhibujú spätný prechod neurotransmitorov zo synaptickej štrbiny do presynaptického neurónu<sup>17</sup>. Antidepressíva sú podľa ATC klasifikácie označované ako skupina N06A. Pri hodnotení dodávok liečiv sa sledujú tri hlavné parametre, a to počty dodávaných balení, počty definovaných denných dávok a finančné náklady. Za posledné roky bola zaznamenaná výrazne vyššia spotreba antidepressív. V rokoch 2002-2012 bol v ČR zaznamenaný nárast o 65 % vo finančných nákladoch na liečbu depresíí. Na grafe č. 2.1 je zobrazené množstvo počtu dodaných balení antidepressív k spotrebe a DDD v období 2002-2012<sup>18</sup>.

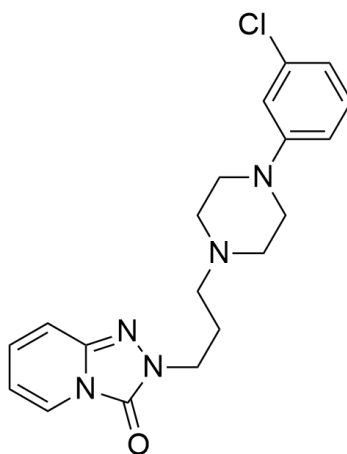
Graf 2.1: Vývoj dodávok antidepresív v počtoch balení a DDD v ČR za roky 2002-2012 (SÚKL 2013)<sup>18</sup>.



### 2.3.1 Využitie trazodónu pri liečbe depresie

Trazodón, triazolpyridínový derivát, v ČR predávaný pod názvom Trittico AC, má vlastnosti tricyklických antidepresív a takisto je účinný aj ako selektívny inhibítor spätného vychytávania sérotonínu (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors–SSRI) a noradrenalínu. Má rýchly nástup účinku, nespôsobuje nespavosť ani poruchy sexuálnych funkcií<sup>19</sup>. Užíva sa v prípade výrazných úzkostí a samovražedných sklonov, tiež pri mentálnej anorexii<sup>17</sup>. Obrázok č. 2.3 predstavuje štruktúru trazodónu.

Obr. 2.3: Trazodón 2-[3-[4-(3-chlórfenyl)-1-piperazinypropyl]-1,2,4-triazolo [4,3-a]pyridín-3(2H)-ón<sup>20</sup>.



V roku 2012 v ČR malo liečivo Trittico AC 150 (liečivá látka trazodón) najväčšie dodávky zo skupiny N06AX – iné antidepresíva. Počet kusov balení tejto skupiny antidepresíva DDD sú vyobrazené v tabuľke č. 2.2<sup>18</sup>.

Tab. 2.2: *Distribúcia skupiny „iné antidepresíva“ v počte balení za roky 2002-2012 (SÚKL 2013)*<sup>18</sup>.

Kód ATC5	Názov ATC5	Rok	Počet balení	Financie bez OP a DPH	Celkom DDD
N06AX	Iné antidepresíva	2002	604 855	132 498 277	6 091 714
		2003	724 838	151 330 626	7 725 789
		2004	729 079	169 834 741	9 147 311
		2005	903 298	208 304 894	13 235 805
		2006	870 273	216 425 424	16 072 003
		2007	986 875	241 450 367	21 692 484
		2008	1 131 098	279 575 148	26 250 886
		2009	1 278 496	327 439 245	31 567 357
		2010	1 362 380	336 593 333	34 435 729
		2011	1 468 935	242 144 582	37 780 997
		2012	1 569 581	268 351 796	40 678 818

### 2.3.2 Metabolizmus xenobiotík v živočíšnej a rastlinnej ríši

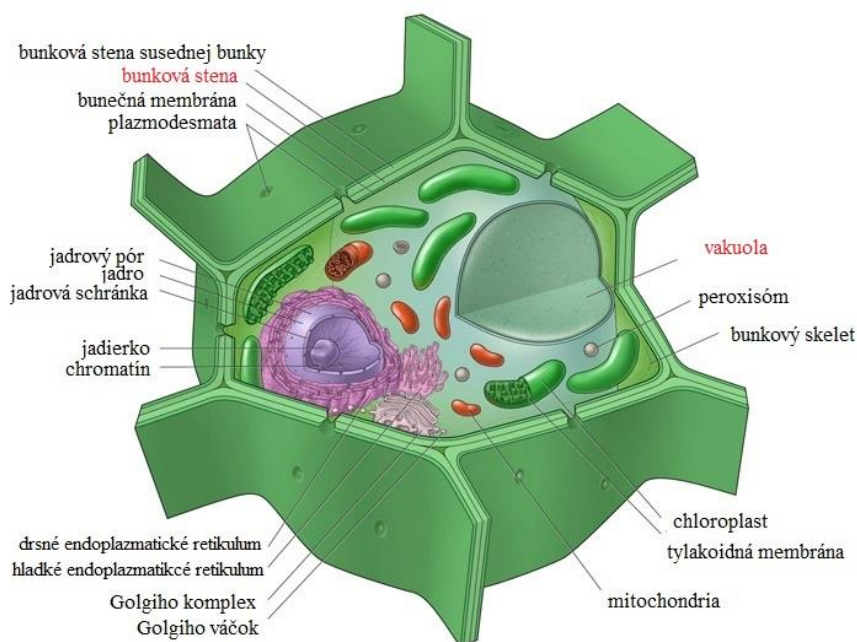
Rastliny aj živočíchy sú vystavené pôsobeniu kontaminantov v životnom prostredí. Človek môže prijímať xenobiotiká z vlastnej vôle v podobe liečivých prípravkov, ale aj neúmyselne, požitím jedov, pesticídov alebo vdýchnutím odpadných produktov v plynnom skupenstve. Tieto látky neprechádzajú organizmom v nezmenenej forme, ale podliehajú biotransformáciám, pričom sú na základe rôznych metabolických dráh premieňané na zlúčeniny netoxické alebo menej toxické.

V závislosti na chemickej štruktúre sa môžu škodlivé zlúčeniny dostávať do organizmu rôznymi cestami – kožou, pľúcami, ale najčastejšou je perorálna cesta, kedy sa látka absorbuje do čreva a následne sa dostáva do pečene, ktorá je hlavným dejiskom biotransformácií. Xenobiotikum sa častokrát viaže na proteíny alebo bunky, čo je v prípade prijímania farmák výhodou, pretože môže dochádzať k postupnému uvoľňovaniu liečiva. Cudzorodé látky a ich metabolity sa môžu v tele ukladať, ale v konečnej fáze aj tak dôjde k ich eliminácii. Za biotransformácie sú zodpovedné enzýmy, ktoré sa nachádzajú ako u človeka, tak aj v rastlinách, živočíchoch, či baktériách. Metabolizácia prebieha v dvoch fázach, pričom nie je nutné, aby xenobiotikum prešlo oboma fázami<sup>21</sup>.

U človeka a živočíchov dochádza v prvej fáze (derivatizácia) k zvýšeniu polarity látky. Počas nej prebiehajú oxidoredukčné reakcie, čím vzniká produkt obsahujúci novú hydroxylovú skupinu, ktorá mohla vzniknúť buď hydroxylačnou reakciou, alebo redukciou. V druhej fáze (konjugačná fáza) reagujú funkčné skupiny z prvej fáze s molekulami, ktoré majú endogénny pôvod, napríklad s kyselinou glukorónovou alebo sírovou a dochádza ku konjugáciám, ktorá spočíva v odstránení lipofility xenobiótika a uľahčení exkrécie z organizmu, ktorá predstavuje tretiu fázu<sup>21</sup>.

V prípade rastlín sú prvé dve fázy metabolizmu xenobiótík veľmi podobné. Odlišná je tretia fáza, keďže rastliny nemajú vylučovaciu dráhu ako živočíchy. Dochádza k uskladňovaniu produktov metabolizmu, buď vo vakuole (pre rozpustné konjugáty) alebo v bunkovej stene (pre nerozpustné konjugáty) na obrázku č. 2.4.

Obr. 2.4: Rastlinná bunka <sup>22</sup>.

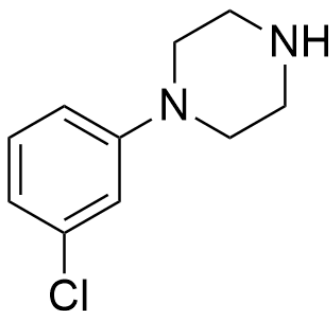


Väčšina xenobiótík patrí medzi perzistentné a toxické látky, ktorých hromadenie ohrozuje potravinový reťazec a ľudský organizmus<sup>8</sup>. Bolo preukázané, že rastliny obsahujú enzýmy, ktoré sú podobné živočíšnym enzýmom v pečeni, konkrétne cytochróm P450 monooxygenáze a glutatión transferáze. Tieto rastliny sú označované ako „zelená pečeň“, pretože pôsobia ako globálny pohlcovač polutantov, schopný metabolizovať veľké množstvo xenobiótík, vrátane polychlórovaných a polycyklických uhlíkov<sup>23</sup>.

### 2.3.3 Metabolizmus trazodónu

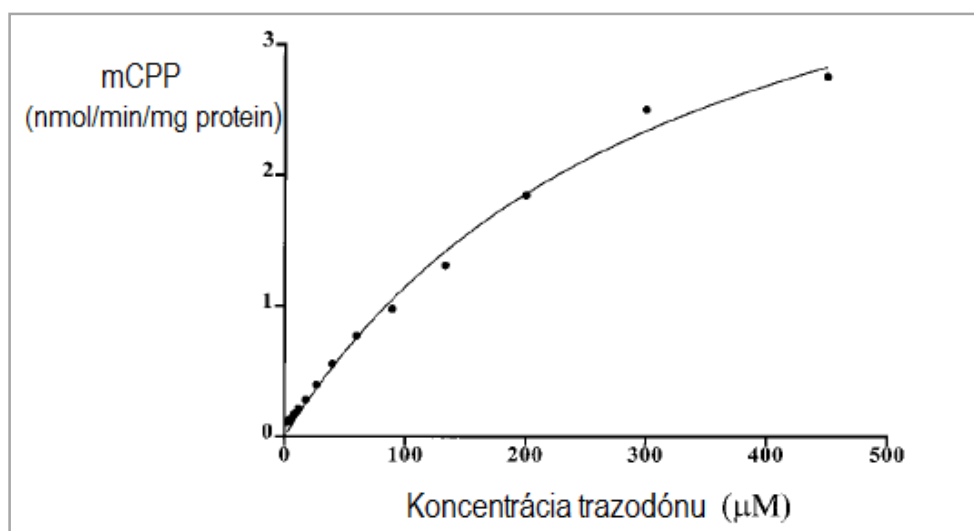
Cytochróm P450 3A4, skrátene CYP3A4 (EC 1.14.13.97) patrí do rodiny enzýmov cytochrómu P450 . Je dôležitým enzýmom v pečeni a čreve a jeho úlohou je oxidovať malé cudzorodé organické molekuly, napríklad toxíny alebo farmaká tak, aby mohli byť odstránené z tela. Jedná sa o hemoproteín, ktorý obsahuje atóm železa. Proteíny cytochrómu P450 sú monooxygenázy a podieľajú sa na metabolizme liekov a syntéze lipidov, či steroidov. Tento proteín je lokalizovaný v endoplazmatickom retikule (obr. 2.4) a podieľa sa na metabolizme približne polovice dnes používaných liekov vrátane trazodónu, kodeínu, diazepamu, acetaminofénu. Cytochróm P450 sa účastní metabolizmu exogénnych aj endogénnych látok a svojim priestorovým usporiadaním a veľkým aktívnym miestom je schopný naviazať viacero ligandov súčasne. Enzým je schopný vykonávať rôzne chemické premeny, napríklad hydroxyláciu, epoxidáciu olefinov, aromatické oxidácie a iné<sup>24, 25</sup>. Hlavným metabolitom psychotropnej látky trazodón je *meta*-chlórphenylpiperazín (*mCPP*) zobrazený na obrázku č. 2.5.

Obr. 2.5: *Meta*-chlórphenylpiperazín (*mCPP*)<sup>26</sup>.



Trazodón sa metabolizuje v pečeni hydroxyláciou, dealkyláciou a N-oxidáciou. Aktívny metabolit *m*CPP je tvorený N-dealkyláciou piperazinyľ dusíka. Bolo dokázané, že na formáciu metabolitu *m*CPP je potrebný enzým CYP3A4. Ako táto štúdia ukázala, na vytvorenie tohto metabolitu je potrebná istá koncentrácia trazodónu<sup>26</sup>. Závislosť koncentrácie trazodónu na tvorbe *m*CPP pri spomínanej štúdii je zobrazená na grafe č. 2.2.

Graf 2.2: Aktivita *m*CPP v závislosti na koncentrácii substrátu – trazodónu<sup>26</sup>.



### 3. CIEĽ BAKALÁRSKEJ PRÁCE

Cieľom bakalárskej práce bolo štúdium reziduí farmák zo životného prostredia za pomoci bioremediačných techník. Práca spočívala v schopnosti fytoextrakcie liečiva trazodónu z vodného prostredia *in vitro* kultivovanými rastlinami. Použité bolo antidepresívum trazodón, vydávané na lekársky predpis, ktorého užívanie v posledných rokoch vzrástlo takmer o 100 %. Trazodón, predávaný pod názvom Trittico AC 75/150, mal za posledné roky najvyššiu dodávku spomedzi antidepresív patriacich do skupiny „iné antidepresíva“. S rastúcim využívaním tohto typu liečiv sa časom zvyšuje záťaž pre odpadové vody, ktoré v čistiarnach odpadových vôd nie sú úplne prefiltrované, a tak zasahujú do životného prostredia. V čistiarnach odpadových vôd nie je tento typ látok úplne eliminovaný a ich reziduá tak vstupujú do životného prostredia. Štúdium spočívalo práve v zachytení zostatkových koncentrácií trazodónu pomocou fytoimediačných technológií.

Práca predstavuje:

- Spracovanie literatúry a poznatkov týkajúcich sa fytoimediačných techník
- Štúdium interakcií trazodónu s rastlinami *in vitro* v sterilnom prostredí
- Odber vzoriek z médií kultivovaných rastlín *Zea mays* v pravidelných intervaloch
- Separácia a stanovenie koncentrácií trazodónu pomocou HPLC
- Vyhodnotenie účinnosti fytoextrakcií za použitia tejto rastliny

## 4. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

### 4.1 Použitý materiál

#### 4.1.1 Použité chemikálie

- Trazodón hydrochlorid, čistota  $\geq 99\%$  (Sigma Aldrich)
- Acetonitril HPLC Gradient grade (Fisher Scientific UK)
- Metanol HPLC Gradient grade (Fisher Scientific UK)
- Kyselina fosforečná, čistota  $\geq 99,99\%$  (Sigma Aldrich)
- SAVO originál (UNILEVER s.r.o.)
- Chemikálie potrebné na prípravu média podľa Murashiga a Skooga (Lach-Ner s.r.o), zloženie média je zobrazené v tabuľke č. 4.1
- Voda na prípravu médií a komponent mobilnej fázy – pripravená na prístroji WATEK ROI (reverzná osmóza, iontomenič, uhlíkový filter)

Tab. 4.1: *Murashige a Skoog médium (bez prídavku sacharózy)*<sup>27</sup>.

<i>Makro prvky</i>	<i>c [mg.L<sup>-1</sup>]</i>	<i>Mikro prvky</i>	<i>c [mg.L<sup>-1</sup>]</i>
KNO <sub>3</sub>	1900	MnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	22,3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	ZnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	8,3
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	440	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	370	KI	0,83
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0,25
		CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0,025
		CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0,025
<i>Myo</i> -inositol	100		



#### 4.1.2 Rastliny použité na experiment

Ako rastlinný materiál bolo použité osivo kukurice siatej – *Zea mays*, konkrétne hybridná odroda DKC 4014 od spoločnosti Monsanto ČR. Kultivovanie rastlín prebiehalo v MS živnom médiu. Zloženie MS média je popísané v tabuľke č. 4.1.

#### 4.1.3 Prístrojové vybavenie

- Laminárny box s vertikálnym prúdením vzduchu FBB 120 (Labox)
- Kultivačné boxy – kultivačná miestnosť, v ktorej bola udržiavaná teplota na 26°C, svetelný režim 16h svetlo/8 hodín tma, osvetlenie žiarovkami COOL WHITE36 W/m<sup>2</sup> vo vzdialenosti 40 cm
- Mraziaci box (Liebherr) udržiavaný pri teplote -20 °C
- Tlakový hrniec na sterilizáciu médií a nástrojov (Morphy Richards Rapid Cook)
- Kahan Fuego pro, WLD-Tec
- Ultrazvukový kúpeľ Fisherbrand ®FB 15050
- Centrifúga Spectrafuge TM 16M (Labnet)
- HPLC analýza bola uskutočnená na chromatografickom zariadení INCOS, zložený z vysokotlakového čerpadla INCOS LCP 5020, autosampléru INCOS LCS 5040 a UV detektoru INCOS 5000. Kolóna Eclipse XDB C18 (5µm) mala rozmery 250×4,6 mm (AGILENT) , predkolóna C18 (WATREX)

Jednotlivé vzorky o objeme 20 µL boli aplikované autosamplérom. Na spracovanie jednotlivých dát bol použitý chromatografický program Clarity, vrátane kalibrácie. Podmienky pre jednotlivé merania sú v tabuľke č. 4.2.

Tab. 4.2: *Chromatografické podmienky pri uskutočnenom meraní.*

Látka	Trazodón
Mobilná fáza	Acetonitril/voda/kyselina fosforečná 30 : 70 : 0,1 (v/v/v)
Prietok [ml.min <sup>-1</sup> ]	1,0 ml.min <sup>-1</sup>
UV detekcia [nm]	247 nm

## 4.2 Postup práce

### 4.2.1 Kultivácia rastlinného materiálu *in vitro* metódou

Pri príprave *in vitro* kultúr boli použité semenka kukurice siatej (*Zea mays*), ktoré boli na 30 sekúnd ponorené do 70% etanolu, aby došlo k potrebnému odmasteniu. Po dobu 10 minút boli sterilizované v 20% roztoku SAVA. Ďalšia sterilizácia bola realizovaná po dobu 20 minút v 10% roztoku SAVA. Semienka boli následne dvakrát premyté sterilnou vodou a tretíkrát zostali ponechané vo vode. Po sterilizácii bola kukurica za sterilných podmienok, v laminárnom boxe, vysádzaná do MS média, podľa Murashiga a Skooga bez pridanej sacharózy. Zloženie média je popísané v tabuľke č. 4.1. Každá Erlenmeyerova banka o objeme 500 mL obsahovala 15 mL média a štyri semienka. Každá banka bola uzatvorená pomocou alobalu, aby nedošlo ku kontaminácii z vonkajšieho prostredia. Semienka boli ponechané v kultivačných boxoch po dobu 14 dní v striedavom režime 16 hodín svetlo/8 hodín tma. Kultivácie, ktoré boli kontaminované plesňou boli postupne odstránené. Po 14 dňoch boli rastliny dostatočne veľké a mohla byť zahájená fytoextrakcia. Pôvodné médium bolo z baniek vyliate a do každej banky bolo pridaných 100 mL MS média a zásobný roztok trazodónu, tak aby výsledná koncentrácia v médiu bola 10 mg.L<sup>-1</sup>.

#### 4.2.2 Fytoextrakcia trazodónu

Po aplikácii média obohateného o trazodón s koncentráciou  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  vo výslednom roztoku bola z každej kultivácie pomocou sterilnej ihly a striekačky odobraná kontrolná vzorka o približnom objeme 0,5 mL. Odbery boli spravené počas piatich dní, a to presne po 24, 48, 72, 96, 168 hodinách. Všetky vzorky boli umiestnené v mraziacom boxe. Po ukončení odberov boli rastliny taktiež zmrazené a ponechané v mraziacom boxe pre ďalšie analýzy. Všetky vzorky boli pred meraním centrifugované a ďalej analyzované na HPLC, kde boli určené jednotlivé koncentrácie trazodónu v danom čase odberu. Na obrázku č. 4.1 sú zobrazené kultivácie rastliny *Zea mays* sedem dní po vysadení.

Obr 4.1: Kultivácie kukurice siatej týždeň po vysadení (Zdroj: vlastná fotografia).



#### 4.2.3 HPLC analýza roztokov trazodónu

Chromatografické podmienky pre analýzu roztokov trazodónu boli robené na kolóne Eclipse XDB C18 o rozmeroch  $250 \times 4,6 \text{ mm}$  (AGILENT). Pri výbere mobilnej fáze boli vyskúšané zloženia obsahujúce trietylamín<sup>28</sup>, no za použitia vyššie popísaných chromatografických podmienok nedošlo k separácii analyzovanej látky, preto nemohli byť chromatogramy použité na analýzu. Testované boli aj prietoky mobilnej fáze, a to  $0,6\text{--}1,2 \text{ mL.min}^{-1}$ . Ako finálne optimálne podmienky boli zvolené nasledovné: mobilná fáza acetonitril/voda/kyselina fosforečná 30:70:0,1 (v/v/v), prietok  $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$ , detekcia UV 247 nm.

## 5.VÝSLEDKY A DISKUSIA

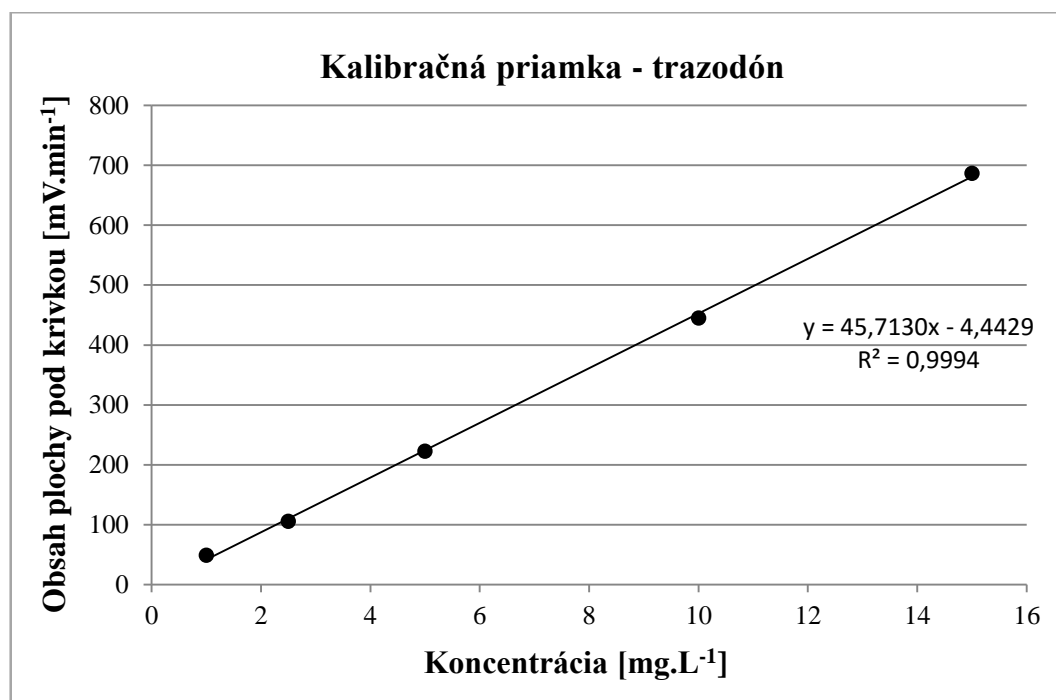
Z viacerých experimentov vyplýva, že napriek prečisteniu vody v čistiarniach odpadových vôd farmaceutické substancie zostávajú naďalej prítomné v životnom prostredí v koncentráciách  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Napriek nízkej koncentracii ohrozujú ľudský organizmus. V posledných rokoch je fytoextrakcia považovaná za neagresívnu metódu na odstránenie organických, či anorganických polutantov z odpadových vôd alebo na dodatočné prečistenie vody z ČOV. V prípade organických látok sa jedná hlavne o farmaká, ktoré sa v dôsledku vysokej spotreby dostávajú do životného prostredia, kde môžu pretrvávajúť a mať negatívny dosah na prírodu i človeka.

Táto práca bola zameraná na štúdium účinnosti a využitia fytoextrakcie pri eliminácii farmaceutického produktu predávaného pod názvom Trittico s účinnou látkou trazodón. Modelové *in vitro* experimenty boli uskutočnené na rastlinách kukurice siatej *Zea mays*. Pri experimente bol ku desiatim kultiváciám pridaný roztok trazodónu, tak, aby bola výsledná koncentrácia trazodónu  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Následne boli uskutočnené odbery vzoriek počas piatich dní a aktuálne koncentrácie boli stanovované metódou HPLC.

## 5.1 Kalibrácia

Kalibrácia trazodónu bola spravená na roztokoch o koncentráciách 1; 2,5; 5; 10 a 15 mg.L<sup>-1</sup>. Kalibračná závislosť je zobrazená na grafe č. 5.1. Mobilná fáza bola zložená zo zmesi acetonitril/voda/kyselina fosforečná 30:70:0,1 (v/v/v). Prietok bol nastavený na 1,0 mL.min<sup>-1</sup> a detekcia pri 247 nm.

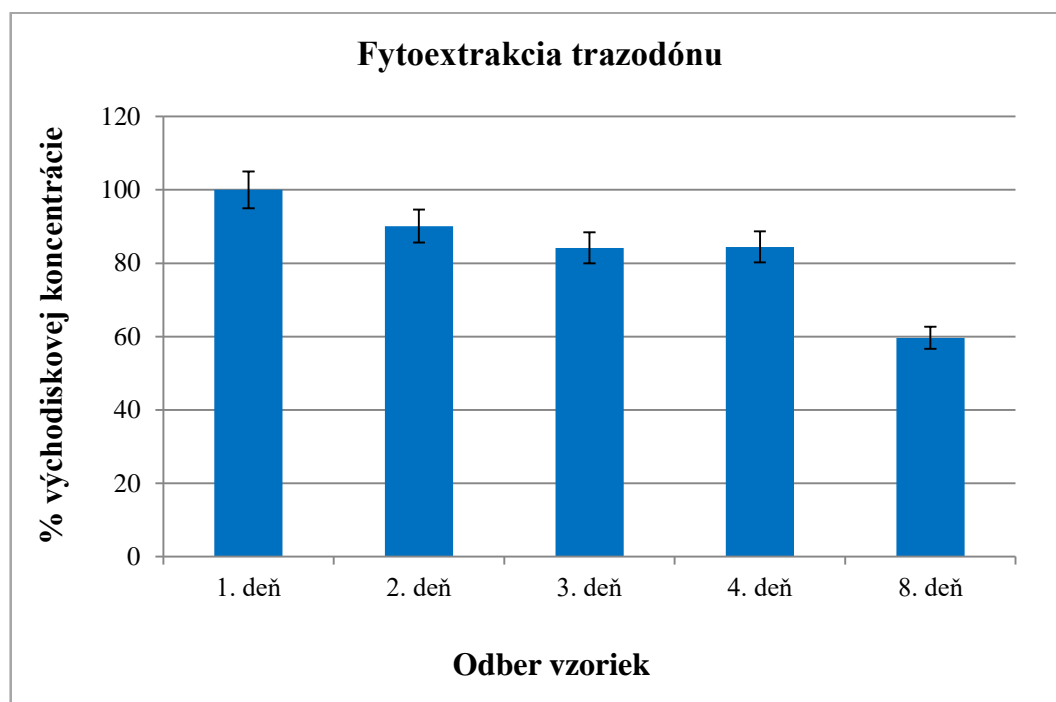
Graf 5.1: Kalibračná priamka trazodónu.



## 5.2 Účinnosť fytoextrakcie trazodónu

Experiment bol uskutočnený na 10 rastlinách, pričom v grafe č. 5.2 sú zobrazené priemery percent východiskovej koncentrácie. Hodnoty na ose x predstavujú jednotlivé dni, počas ktorých boli vzorky odobrané. Prvý deň predstavuje odber v čase 0 hodín, 2. deň – 24 hodín, 3. deň – 48 hodín, 4. deň – 72 hodín a 8. deň – 168 hodín po pridaní zásobného roztoku trazodónu o východiskovej koncentrácii 10 mg.L<sup>-1</sup>. Koncentrácia trazodónu bola stanovená pomocou HPLC s UV detekciou pri 247 nm. Pri experimente bola použitá mobilná fáza acetonitril/voda/kyselina fosforečná v pomere 30:70:0,1 (v/v/v). Prietok mobilnej fázy bol nastavený na 1,0 ml.min<sup>-1</sup>.

Graf č. 5.2: Závislosť množstva trazodónu prítomného v MS médiu (uvádzané v % východiskovej koncentrácie) na čase ( $n=10$ ).

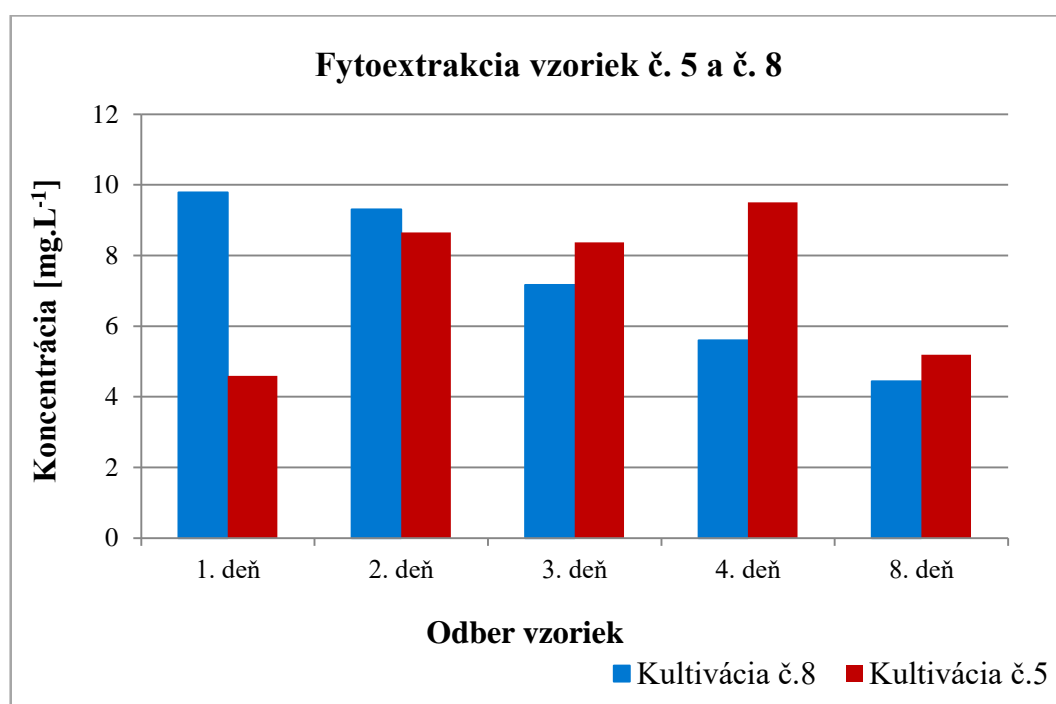


Z výsledkov je možné pozorovať, že fytoextrakcia bola úspešná, ale za daný časový úsek neprebehla úplná eliminácia farmaka. Na začiatku experimentu, kedy bol pridaný zásobný roztok trazodónu o koncentrácii  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  dosahovala priemerná koncentrácia vzoriek približne 90 %, čo činilo  $9,01 \text{ mg.L}^{-1}$ , ktorá je ďalej považovaná za vstupnú koncentráciu (100 %). Rozdiel medzi teoretickou a nameranou koncentráciou mohol byť spôsobený nedokonalým odstránením pôvodného média pred pridaním média obsahujúceho trazodón, čím mohlo dôjsť k nariedeniu a zníženiu koncentrácie, čo by odpovedalo výsledkom z prvého dňa. Ďalším a pravdepodobnejším dôvodom úbytku koncentrácie počas prvého dňa mohla byť primárna adsorpcia koreňovými časťami rastlín, kde sa nejednalo o fytoextrakčný ani metabolický dej rastlinného systému. Ako sa predpokladalo, hodnoty koncentrácií trazodónu počas prvých troch dní klesli v priemere z  $9,01 \text{ mg.L}^{-1}$  na  $7,59 \text{ mg.L}^{-1}$  čo predstavuje 5-10% pokles. Je zaujímavé, že klesajúci trend sa v deň odberu po 72 hodinách mierne zvýšil na  $7,61 \text{ mg.L}^{-1}$ . Tento jav mohol byť spôsobený opätovným vylúčením adsorbovaného trazodónu z koreňov rastliny do roztoku. Predpokladalo sa, že došlo ku kontaminácii alebo odumieraniu rastlinných častí, a z toho dôvodu k zvyšovaniu koncentrácie.

Po ôsmych dňoch od aplikácie zásobného roztoku média obsahujúceho trazodón boli odobrané posledné vzorky zo všetkých desiatich kultivácií. Z nameraných hodnôt vyplynulo, že fytoextrakcia naďalej prebiehala a priemerné hodnoty koncentrácie dosahovali  $5,38 \text{ mg.L}^{-1}$  čo predstavovalo pokles o vyše 40 %.

Počas experimentu nie všetky rastliny vykazovali očakávaný pokles koncentrácie v roztoku MS média obsahujúceho trazodón. Graf č. 5.3 poukazuje na kultivácie č. 5 a č. 8 a ich koncentráciu v čase.

Graf 5.3: Namerané hodnoty koncentrácií u kultivácie č. 5 a č. 8.



Graf porovnáva namerané hodnoty koncentrácií v roztoku média obsahujúceho trazodón pre kultiváciu č. 5 a č. 8. V grafe sú zobrazené hodnoty koncentrácie v  $\text{mg.L}^{-1}$  v závislosti na čase. Hodnoty na ose x predstavujú dni uskutočnených odberov. Prvý deň predstavuje odber v čase 0 hodín, 2. deň – 24 hodín, 3. deň- 48 hodín, 4. deň- 72 hodín a 8. deň 168 hodín po pridaní zásobného roztoku trazodónu o východiskovej koncentrácii  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ .

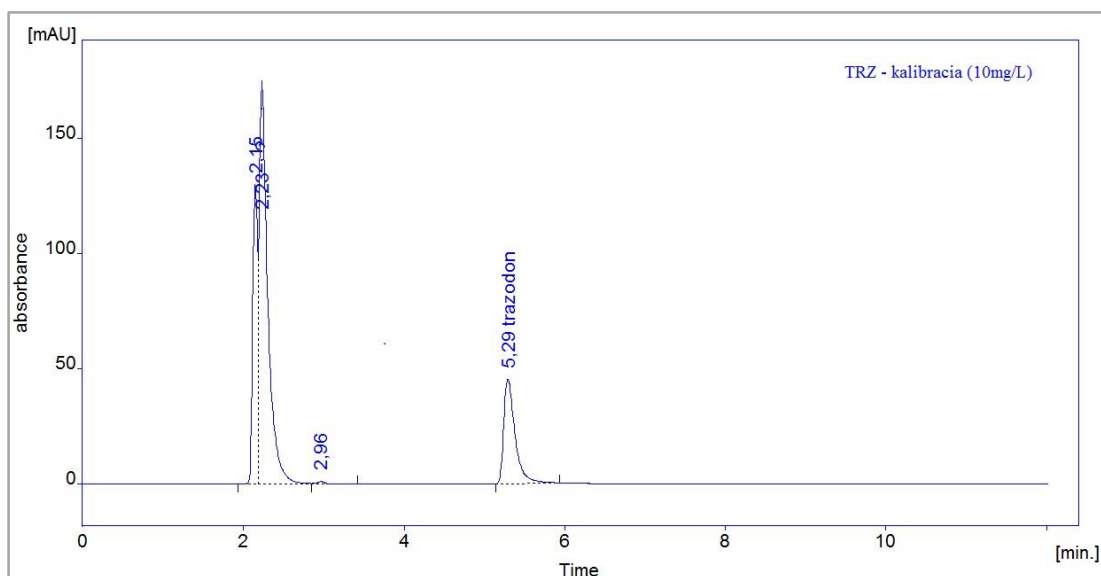
Z priebehu postupného znižovania koncentrácie u rastliny č. 8 môžeme potvrdiť, že klesajúci trend prebiehal tak, ako sa očakávalo. Východisková koncentrácia  $9,78 \text{ mg.L}^{-1}$  bola počas ôsmych dní eliminovaná na  $4,44 \text{ mg.L}^{-1}$ , čo predstavuje pokles

o približne 55 %. V prípade kultivácie č. 5 došlo počas fytoextrakcie k abnormálnemu správaniu rastlinnej kultúry. V prvý deň sa prejavila výrazná adsorpcia koreňovým systémom kultivácie. Ako sa však ukázalo, v priebehu ďalších troch dní koncentrácia narástla na  $9,50 \text{ mg.L}^{-1}$ , čo mohlo byť spôsobené postupným vylúčením látky späť do roztoku. Po 168 hodinách sa preukázala fytoextrakčná schopnosť rastliny kukurice a koncentrácia vykazovala  $5,19 \text{ mg.L}^{-1}$ . Veľmi nízka hodnota na počiatku bola štatisticky vylúčená zo súboru výsledkov, keďže predstavovala voči ostatným výsledkom merania odľahlú hodnotu.

### 5.3 Analýza roztokov

Jednotlivé odobrané vzorky kultivácií boli rozmrazené a centrifugované. Takto pripravené vzorky boli analyzované metódou HPLC. Ako mobilná fáza bola použitá zmes acetonitrilu, vody a kyseliny fosforečnej v pomere 30:70:0,1 (v/v/v). Detekcia UV prebiehala pri 247 nm a prietok mobilnej fázy bol nastavený na  $1,0 \text{ ml.min}^{-1}$ . Na určenie jednotlivých píkov v MS médiu s prídavkom trazodónu bol použitý štandard o koncentrácii  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ . Chromatogram štandardu v MS médiu je zobrazený na obrázku č. 5.1.

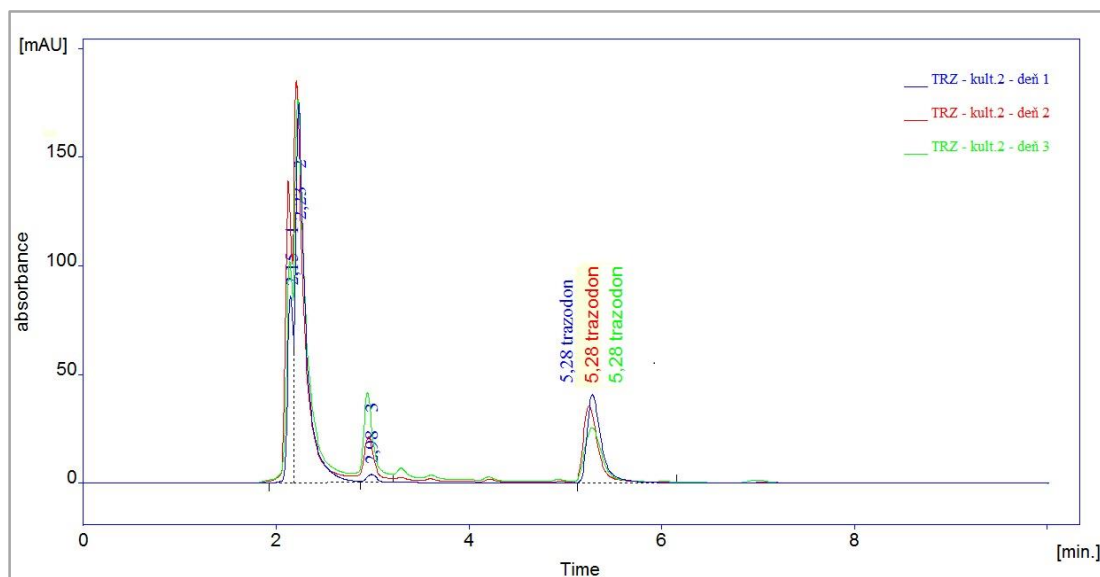
Obr 5.1: Chromatogram kalibračného roztoku o koncentrácii  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ .





Píky eluujúce v druhej až tretej minúte sú zložkami MS média. Pík trazodónu v jednotlivých vzorkách bol určený na základe štandardného roztoku, ktorého retenčný čas bol 5,29 min., pričom koncentrácia píku trazodónu na chromatograme 5.1. činila 9,89 mg.L<sup>-1</sup>.

Obr 5.2: Chromatogram kultivácie č. 2 (24h, 48h, 72h po aplikácii trazodónu).



Retenčný čas trazodónu bol určený na HPCL s UV detekciou 247 nm. Mobilná fáza sa skladala zo zmesi acetonitril/voda/kyselina fosforečná 30:70:0,1 (v/v/v), prietok mobilnej fázy bol 1,0 ml.min<sup>-1</sup>.

Obrázok č. 5.2 zobrazuje chromatografickú analýzu retenčného času pre kultiváciu č. 2 pri 24, 48 a 72 hodinovom odbere. Trazodón eluuje podľa štandardu približne v 5,28 minúte. Píky eluujúce v druhej až štvrtej minúte sú píky MS média, prípadné menšie nečistoty obsiahnuté v roztoku. Fytoextrakcia u rastliny č. 2 prebiehala podľa očakávania. Pík počas prvého dňa na modrej krivke s najvyššou koncentráciou 9,26 mg.L<sup>-1</sup> mal retenčný čas 5,29 min. rovnako ako štandard. Chromatogram zobrazuje pokles koncentrácie počas druhého dňa (červená krivka) s retenčným časom 5,28 min. Najmenší pík vo 4. deň odberu, s retenčným časom 5,25 min. je rovný koncentrácii 6,38 mg.L<sup>-1</sup>.

Pri začatí experimentu bolo k 10 kultiváciám pridaných 10 mg trazodónu. Z nameraných koncentrácií trazodónu bola vypočítaná percentuálna účinnosť

fytoextrakcie, ktorá predstavovala 40,2% pokles v priebehu ôsmich dní. Priemerný úbytok koncentrácie z 10 rastlín bol  $3,62 \text{ mg.L}^{-1}$ . Po rozmrazení a zvážení rastlín aj s koreňmi bola celková hmotnosť 83,0 g. Vyhodnotená bola schopnosť fytoextrakcie 1 gramu rastliny po dobu 8 dní. Jeden gram rastliny extrahoval  $43,6 \text{ }\mu\text{g}$  trazodónu počas 168 hodín, čo je  $5,45 \text{ }\mu\text{g}$  trazodónu za 24 hodín.

## 6. ZÁVER

Fytoremediácia patrí medzi novodobé metódy, ktoré sú v štádiu výskumu, vďaka účinnej eliminácii polutantov zo životného prostredia. Liečivé látky a ich metabolity sú po vylúčení z organizmu a po prečistení v čistiarnach odpadových vôd napriek tomu v nízkych koncentráciách prítomné v odpadových vodách. Na dočistenie odpadových vôd obsahujúcich zvyškové koncentrácie organických látok sa využíva fytoextrakcia.

Na štúdium fytoextrakcie v tejto práci bolo zvolené antidepresívum s účinnou látkou trazodón. Experiment prebiehal v *in vitro* kultúrach na odrode kukurice siatej (*Zea mays*). Kultivácia prebiehala po dobu 14 dní v živnom médiu, kedy boli rastliny uchovávané v sterilných podmienkach. Po dostatočnom vyvinutí rastlín bola skúmaná schopnosť extrakcie trazodónu u 10 nezávislých kultivácií. Účinnosť extrakcie predstavovala približne 50 %. Nižšia účinnosť mohla byť spôsobená toxicitou z vonkajšieho prostredia alebo postupným odumieraním kultivácií. Je možné, že rastlina adsorbovala časť farmaka koreňovou časťou systému alebo sa kontaminant mohol usadiť aj v listovej časti rastliny. Kvôli stanovenému rozsahu tejto práce nebolo možné obsiahnuť aj toto štúdium. Koncentrácia pridaná do jednotlivých kultivácií bola niekoľkokrát vyššia ako sa bežne nachádza v odpadových vodách, a z toho dôvodu je možné, že extrakcia by v reálnom prípade prebiehala rýchlejšie.

Táto technológia sa javí ako výhodná a šetrná k životnému prostrediu a môžeme očakávať jej postupný vývoj. Vhodne použité rastliny by mohli byť tým správnym ekologickým riešením na vyčistenie, prípadné dočistenie podzemných vôd, ktoré sú dôležitým zdrojom pitnej vody pre človeka aj živočíchy.

## 7. LITERATÚRA

- [1] Kotyza J.; Soudek P.; Kafka Z.; Vaněk T.: Léčivá – „Nový“ enviromentálny polutant. *Chemické listy* **103**, 540-547 (2009).
- [2] Leitner P.: *PPCPs – farmaka a produkty osobní péče a vody*. (2010). Dostupné z URL: <<http://www.enviweb.cz/clanek/chemlatky/84704/ppcps-farmarka-a-produkty-osobni-pece-a-vody>> [cit. 10.3.2016]
- [3] Xu J.; Wu L.; Chang A.C.: Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere* **77**, 1299-1305 (2009).
- [4] Kožíšek F.; Jelíková H.: *Prvé systematické mapování léčiv v pitných vodách v ČR*. Praha, (31.1. 2012). Dostupné z URL: <[http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/gacr\\_leciva/Tiskova\\_zprava\\_SZU\\_leciva\\_ve\\_vode.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/chzp/voda/pdf/gacr_leciva/Tiskova_zprava_SZU_leciva_ve_vode.pdf)> [cit. 19.3.2016]
- [5] Shore F.R.; Taggart A.M.; Smits J.; Mateo R.; Richards L.N.; Fryday S.: Detection and drivers of exposure and effects of pharmaceuticals in higher vertebrates. *Philosophical Transaction of the Royal Society, Part B* **369**:20130570 (2014).
- [6] Smrček S.: *Cesty k odmoření vod*. Dostupné z URL: <<http://vesmir.cz/2014/07/16/cesty-odmoreni-vod/>> [cit. 30.2.2016]
- [7] Luptáková D.: *Příprava a fytoextrakcia 125-I značených farmák*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Praha (2013).
- [8] Demnerová K.; Pazlarová J.; Pazlar M.: *Biotechnologie životního prostředí*. Praha, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze (2000).
- [9] Bunker J.P.: The role of medical care in contributing to health improvements within societies. *International Journal of Epidemiology* **30**, 1260-1263 (2001).

- [10] Zhou J.L.; Zhang J.L.; Banks E.; Grover D.; Jiang J.Q.: Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials* **166**, 655-661 (2009).
- [11] Ritter L.; Solomon K.; Sibley P.; Hall K.; Keen P.; Mattu G.; Linton B.: Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and ground water: A perspective prepared for the walker to inquiry. *Journal of Toxicology and Environmenal Health, Part A* **65**, 1-142 (2002).
- [12] Sumpter J.P.: Endocrine Disrupters in the Aquatic Environment: An Overview. *Actahydrochimica et hydrobiologica* **33**, 9-16 (2005).
- [13] Pfitzner R.: *Hormonální léčiva a jiné endokrinní disruptory v životném prostředí*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Praha (2010).
- [14] Vidali M.: Bioremediation. Anoverview. *Pure and Applied Chemistry*, Vol. **73**, No.7, 1163-1172 (2001).
- [15] Bárta J.: *Fytostabilizace – když rostliny hasí naše průšvihy*. Dostupné z URL: <<http://www.gate2biotech.cz/fytostabilizace-kdyz-rostliny-hasi-nase-prusvihy/>> [cit 15.3.2016]
- [16] Soudek P.; Petrová Š.; Benešová D.; Kotyza J.; Vaněk T.: Fytoremediace a možnosti zvýšení jejich účinnosti. *Chemické listy* **102**, 346-352 (2008).
- [17] Hampl F.; Paleček J.: *Farmakochemie*. VŠCHT v Praze, Praha (2002).
- [18] SÚKL. *Hodnocení vývoje distribuce vybrané skupiny léčivých přípravku. Antidepressiva*. Dostupné z URL: <<http://www.sukl.cz/hodnoceni-vyvoje-distribuce-vybrane-skupiny-lecivych-12?highlightWords=antidepressiva>> [cit. 13.3.2016]
- [19] Doležal T.: *Trazodon*. Dostupné z URL: <<http://www.remedia.cz/Clanky/Aktuality/Trazodon/6-E-gg.magarticle.aspx>>[cit. 3.4.2016]
- [20] National Center for Biotechnology Information. *PubChem Compound Database*; CID=5533. Dostupné z URL: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5533>> [cit. 13.3.2016]

- [21] Ledvina M.; Stoklasová A.; Cerman J.: *Biochemie pro studující medicíny II.díl*, Karolinum. Praha (2011).
- [22] Linka T.: *Eukaryotic cell*. Dostupné z URL: <[http://www.tonylinka.com/scientific/plant\\_cell.html](http://www.tonylinka.com/scientific/plant_cell.html)> [cit. 25.4.2016]
- [23] Sandermann Jr. H.: Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biotechnology* **17**, 82-84 (1992).
- [24] Inoue K.; Inazawa J.; Nakagawa H.; Shimada T.; Yamazaki H.; Guengerich F.P.; Abe T.: Assignment of the human cytochrome P-450 nifedipine oxidase gene (CYP3A4) to chromosome 7 at band q22.1 by fluorescence in situ hybridization. *Japan Society of Human Genetics* **37**, 133–138 (1992).
- [25] Meunier B.; de Visser S.P.; Shaik S.: Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. *Chemical Reviews* **104** (9), 3947-3980 (2004).
- [26] Rotzinger S. Fang J. Baker G.B.: Trazodon is metabolized to m-chlorophenylpiperazine by CYP3A4 from human sources. *Drug metabolism and disposition* Vol. **26**, No.6 (1998).
- [27] Murashige T.; Skoog F.: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* **15**, 473 (1962).
- [28] Mercolini L.; Colliva C.; Amore M.; Fanali S.; Raggi M.A. HPLC analysis of the antidepressant trazodone and its main metabolite m-CPP in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Bioremedial Analysis* **47**, 882-887 (2008).